

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

21 October 1999 (21.10.99)

International application No.:

PCT/JP99/01803

Applicant's or agent's file reference:

A005990

International filing date:

06 April 1999 (06.04.99)

Priority date:

08 April 1998 (08.04.98)

Applicant:

MAEDA, Tomoko et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

16 July 1999 (16.07.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

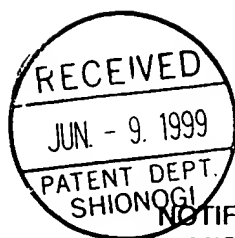
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY



PCT

|                   |
|-------------------|
| Rec. No.          |
| Case. No. G6720W0 |
| Name 1722 Pa      |
| Response          |

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

YAMAUCHI, Hideaki  
Shionogi & Co., Ltd.  
Patent Dept.  
12-4, Sagisu 5-chome  
Fukushima-ku, Osaka-shi  
Osaka 553-0002  
JAPON

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

|  |   |
|--|---|
| Date of mailing (day/month/year)<br>01 June 1999 (01.06.99)          | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b><br><br>International filing date (day/month/year)<br>06 April 1999 (06.04.99)<br><br>Priority date (day/month/year)<br>08 April 1998 (08.04.98) |
| Applicant's or agent's file reference<br>A005990                     |   |
| International application No.<br>PCT/JP99/01803                      |   |
| International publication date (day/month/year)<br>Not yet published |   |
| Applicant<br>SHIONOGI & CO., LTD. et al                              |   |

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u>     | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office<br/>or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt<br/>of priority document</u> |
|--------------------------|---------------------------------|---|---|
| 08 April 1998 (08.04.98) | 10/95962                        | JP  | 31 May 1999 (31.05.99)                          |
| 18 June 1998 (18.06.98)  | 10/170407                       | JP  | 31 May 1999 (31.05.99)                          |

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Carlos Naranjo

Telephone No. (41-22) 338.83.38



|   |           |  |
|---|-----------|--|
| <b>(51) 国際特許分類6</b><br><b>C12N 5/00, A61K 45/00</b>   | <b>A1</b> | <b>(11) 国際公開番号</b><br><b>WO99/53023</b><br><br><b>(43) 国際公開日</b><br>1999年10月21日(21.10.99)  |
| <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP99/01803<br><br><b>(22) 国際出願日</b><br>1999年4月6日(06.04.99)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平10/95962      1998年4月8日(08.04.98)      JP<br>特願平10/170407      1998年6月18日(18.06.98)      JP<br><br><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br>塩野義製薬株式会社(SHIONOGI & CO., LTD.)[JP/JP]<br>〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号<br>Osaka, (JP)<br><b>(72) 発明者 ; および</b><br><b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)</b><br>前田 朋子(MAEDA, Tomoko)[JP/JP]<br>〒658-0051 兵庫県神戸市東灘区住吉本町1-1-39-402<br>Hyogo, (JP)<br>鈴木 隆二(SUZUKI, Ryuji)[JP/JP]<br>〒636-0941 奈良県生駒郡平群町緑ヶ丘3-1-21 Nara, (JP)<br>越智 隆弘(OCHI, Takahiro)[JP/JP]<br>〒654-0071 兵庫県神戸市須磨区須磨寺町1-3-7 Hyogo, (JP)   |           | <b>(74) 代理人</b><br>弁理士 山内秀晃(YAMAUCHI, Hideaki)<br>〒553-0002 大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号<br>塩野義製薬株式会社 特許部 Osaka, (JP)<br><br><b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)<br><br><b>添付公開書類</b><br>国際調査報告書 |
| <b>(54)Title:    METHODS FOR ISOLATING OSTEOCLAST PRECURSOR CELLS AND INDUCING THE DIFFERENTIATION OF THE SAME INTO OSTEOCLASTS</b><br><br><b>(54)発明の名称</b> 破骨細胞前駆細胞の単離並びにその破骨細胞への分化誘導法<br><br><b>(57) Abstract</b><br>A method for differentiating osteoclast precursor cells into osteoclasts characterized by culturing the osteoclast precursor cells in the absence of any feeder cell; a method for isolating exclusively osteoclast precursor cells by culturing peripheral blood or joint liquid in the absence of any cytokine for 1 to 3 weeks; osteoclast precursor cells characterized by being isolated by the above method; a method for differentiating the osteoclast precursor cells obtained by the above method into osteoclasts characterized by culturing the osteoclast precursor cells in the absence of any feeder cell; osteoclasts characterized by being obtained by the above method; a method for screening remedies for bone metabolic diseases characterized by using the osteoclast precursor cells or the osteoclasts as described above; and remedies for bone metabolic diseases obtained by the above screening method. |           |  |

本発明は、破骨細胞前駆細胞を支持細胞非存在下で培養することを特徴とする当該破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法、末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で1～3週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法、本発明の方法により単離されることを特徴とする破骨細胞前駆細胞、破骨細胞前駆細胞を支持細胞非存在下で培養することを特徴とする本発明により得られた当該破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法、本発明の方法により得られたことを特徴とする破骨細胞、本発明の破骨細胞前駆細胞または本発明の破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法、本発明のスクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤、に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

|    |              |    |         |    |                |    |            |
|----|--------------|----|---------|----|----------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦     | DM | ドミニカ    | KZ | カザフスタン         | RU | ロシア        |
| AL | アルバニア        | EE | エストニア   | LC | セントルシア         | SD | スーダン       |
| AM | アルメニア        | ES | スペイン    | LI | リヒテンシュタイン      | SE | スウェーデン     |
| AT | オーストリア       | FI | フィンランド  | LK | スリ・ランカ         | SG | シンガポール     |
| AU | オーストラリア      | FR | フランス    | LR | リベリア           | SI | スロヴェニア     |
| AZ | アゼルバイジャン     | GA | ガボン     | LS | レソト            | SK | スロヴァキア     |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国      | LT | リトアニア          | SL | シエラ・レオネ    |
| BB | バルバドス        | GD | グレナダ    | LU | ルクセンブルグ        | SN | セネガル       |
| BE | ベルギー         | GE | グルジア    | LV | ラトヴィア          | SZ | スワジランド     |
| BF | ブルキナ・ファソ     | GH | ガーナ     | MA | モロッコ           | TD | チャード       |
| BG | ブルガリア        | GM | ガンビア    | MC | モナコ            | TG | トーゴ        |
| BJ | ベナン          | GN | ギニア     | MD | モルドヴァ          | TJ | タジキスタン     |
| BR | ブラジル         | GW | ギニア・ビサオ | MG | マダガスカル         | TZ | タンザニア      |
| BY | ベラルーシ        | GR | ギリシャ    | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TM | トルクメニスタン   |
| CA | カナダ          | HR | クロアチア   |    | 共和国            | TR | トルコ        |
| CF | 中央アフリカ       | HU | ハンガリー   | ML | マリ             | TT | トリニダード・トバゴ |
| CG | コンゴ          | ID | インドネシア  | MN | モンゴル           | UA | ウクライナ      |
| CH | スイス          | IE | アイルランド  | MR | モーリタニア         | UG | ウガンダ       |
| CI | コートジボアール     | IL | イスラエル   | MW | マラウイ           | US | 米国         |
| CM | カメルーン        | IN | インド     | MX | メキシコ           | UZ | ウズベキスタン    |
| CN | 中国           | IS | アイスランド  | NE | ニジェール          | VN | ヴェトナム      |
| CR | コスタ・リカ       | IT | イタリア    | NL | オランダ           | YU | ユーゴスラビア    |
| CU | キューバ         | JP | 日本      | NO | ノールウェー         | ZA | 南アフリカ共和国   |
| CY | キプロス         | KE | ケニア     | NZ | ニュージーランド       | ZW | ジンバブエ      |
| CZ | チェコ          | KG | キルギスタン  | PL | ポーランド          |    |            |
| DE | ドイツ          | KP | 北朝鮮     | PT | ポルトガル          |    |            |
| DK | デンマーク        | KR | 韓国      | RO | ルーマニア          |    |            |

## 明細書

## 破骨細胞前駆細胞の単離並びにその破骨細胞への分化誘導法

5 技術分野

本発明は、破骨細胞前駆細胞を支持細胞非存在下で培養することを特徴とする  
当該破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法、破骨細胞前駆細胞のみを単  
離する方法、該破骨細胞前駆細胞または該破骨細胞を用いたスクリーニング方法  
およびそのスクリーニング方法により得られた骨代謝疾患治療剤に関するもので  
10 ある。

背景技術

哺乳類の骨組織は、骨吸収と骨形成を繰り返している。そして、成長期はもち  
ろん、個体が成熟した後もカルシウム代謝の中心として機能しながら骨吸収と骨  
15 形成のバランスが保たれている。

これは破骨細胞と骨芽細胞との間で密接な情報伝達が行われて、骨吸収と骨形  
成のバランスが保たれているためである。

しかし、骨吸収と骨形成のバランスが崩れると骨代謝疾患が生じる。骨代謝疾  
患としては、骨粗鬆症、慢性関節リウマチ、変形性関節症、糖尿病にともなう骨  
20 量の減少、種々のホルモン異常、栄養障害、大理石病、骨軟化症などが挙げられ  
るが、病態の細胞学的解明はあまり進んでいないのが現状である。

従って、これら骨代謝疾患を解明し、治療薬を開発するためには、破骨細胞や  
骨芽細胞の単離と性状解析が必要とされてきた。

従来、破骨細胞の単離に関する研究は、主にマウスやラットにおいて進められ  
25 てきたが、近年はヒト破骨細胞の単離について研究が進められており、

Fujikawa, Y., Sabokbar, A., Neale, S., and Athanasou, N.A., "Human osteoclast

formation and bone resorption by monocytes and synovial macrophages in rheumatoid arthritis "Annals of Rheumatic Diseases.55;816-822,1996.において、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織からマウス骨芽細胞様細胞株の存在下で破骨細胞を得ることが報告されている。該報告においては、マウス骨芽細胞様細胞株の存在下でヒト破骨細胞を得ている。これは破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化は、骨髓ストローマ細胞や骨芽細胞などとの協調により起こるため、in vitro における破骨細胞前駆細胞の分化誘導には骨髓ストローマ細胞や骨芽細胞などの支持細胞の存在が不可欠であると考えられていたためである。

一方、特開平 7-194373 では、骨髓ストローマ細胞又は骨芽細胞を含まない培地にて、骨髓細胞を、骨芽細胞、破骨細胞又は軟骨細胞に分化させる方法について記述しているが、破骨細胞自体の単離には成功していない。

破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化機構を解析のためには、破骨細胞の前駆細胞から破骨細胞への分化に関与する因子が少ない、特に支持細胞を必要としない単離および破骨細胞への分化誘導方法の確立が望まれていた。

15

#### 発明の開示

本発明者らは、破骨細胞への分化誘導について鋭意研究を重ねた結果、破骨細胞前駆細胞を支持細胞非存在下で培養することを特徴とする当該破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法、破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法、該方法により単離された破骨細胞前駆細胞、該方法により単離された破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法、該方法により得られることを特徴とする該破骨細胞、該破骨細胞前駆細胞または該破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法及び該スクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤に関する発明を完成させた。

すなわち、本発明は、

① 破骨細胞前駆細胞を支持細胞非存在下で培養することを特徴とする当該破

骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法；

② 培養条件として I L - 3、I L - 7、G M - C S F、Eotaxin、Eotaxin-2、Eotaxin-3 又はこれら 2 以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地を使用する①に記載の方法；

5 ③ 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清を含む培地を使用する①又は②に記載の方法；

④ 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清がヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である③に記載の方法；

⑤ 末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で 1 ～ 3 週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法；

⑥ 末梢血または関節液をサイトカイン非存在の哺乳類細胞基本培地に添加し、35 ～ 37℃、5 ～ 7% CO<sub>2</sub> 下で 1 ～ 3 週間培養することにより、破骨細胞前駆細胞を除く細胞を死滅させ、破骨細胞前駆細胞のみを単離する⑤に記載の方法；

15 ⑦ ⑤または⑥に記載の方法により単離されることを特徴とする破骨細胞前駆細胞；

⑧ 破骨細胞前駆細胞を支持細胞非存在下で培養することの特徴とする、⑤または⑥に記載の方法により得られた当該破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法；

20 ⑨ 培養条件として I L - 3、I L - 7、G M - C S F、Eotaxin、Eotaxin-2、Eotaxin-3 又はこれら 2 以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地を使用する⑧に記載の方法；

⑩ 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清を含有する培地を使用する⑧または⑨に記載の方法；

25 ⑪ 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清がヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である⑩に記載の方法；



⑫ ①～④、⑧～⑪に記載の方法により得られたことを特徴とする破骨細胞；

⑬ ⑤または⑥に記載の方法により単離された破骨細胞前駆細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法；

⑭ ⑦に記載の破骨細胞前駆細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤  
5 のスクリーニング方法；

⑮ ①～④、⑧～⑪に記載の方法により分化された破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法；

⑯ ⑦に記載の破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリー  
ーニング方法；

10 ⑰ ⑬～⑯に記載のスクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤、に  
関する。

本発明の1つは、支持細胞非存在下で培養することを特徴とする破骨細胞前駆  
細胞を破骨細胞に分化させる方法に関する。この場合、「支持細胞」とは、破骨  
15 細胞前駆細胞に対し、接着および液性因子の産出を通じて、その分化誘導を行な  
うことができる間葉系細胞を意味する。「支持細胞」としては、骨髓ストローマ  
細胞、骨芽（細胞様）細胞、線維芽細胞、腫瘍細胞などが例示される。「破骨細  
胞前駆細胞」とは、夾雑細胞を実質的に含まない破骨細胞前駆細胞を意味し、具  
体的にはヒト破骨細胞前駆細胞である。「破骨細胞前駆細胞」とは、適当な培養  
20 条件下で破骨細胞に分化する能力を有する造血幹細胞由来の細胞を意味する。「破  
骨細胞」とは、夾雑細胞を実質的に含まない破骨細胞を意味し、具体的にはヒト  
破骨細胞である。「破骨細胞」は、多核（ $N > 3$ ）で、酒石酸耐性酸フォスファ  
ターゼ染色により陽性反応を示し、骨吸収能を有する細胞を意味する。

さらに、本発明は、IL-3、IL-7、GM-CSF、Eotaxin(Kitaura, M.  
25 et al., J. Biol. Chem., 271, 13, 7725-7730, 1996)、Eotaxin-2(Forssmann, U. et al.,  
J. Exp. Med., 185, 12, 2171-2176, 1997)、Eotaxin-3(ヒト CC 型ケモカイン。塩

基配列を配列番号：1に、アミノ酸配列を配列番号：2に示す)又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地で、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる方法に関する。IL-3、IL-7、GM-CSF、Eotaxin、Eotaxin-2またはEotaxin-3は、天然型あるいは組換え型のいずれであってもよい。IL-3、IL-7、GM-CSF、Eotaxin、Eotaxin-2またはEotaxin-3又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地として、単核球マイトジェン刺激培養上清を含有する培地を用いてもよい。末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清としては、ヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清を用いる場合もある。

- 10      また、本発明は、末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で1～3週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法に関する。具体的には末梢血または関節液を、サイトカイン「非存在下で」あるいは「不含の」哺乳類細胞基本培地に添加し、35～37℃、5～7%CO<sub>2</sub>下で1～3週間培養することにより、破骨細胞前駆細胞を除く細胞を死滅させ、破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法、または該方法により得られることを特徴とする破骨細胞前駆細胞に関するものである。
- 15

「末梢血」とは、哺乳動物の末梢血であり、具体的にはヒト末梢血である。ヒト末梢血を使用する場合には、健常人の末梢血を用いることが出来る。

- 「関節液」としては、健常人の関節液を用いることもできるが、具体的には慢性関節リウマチ(RA)患者の関節より得られた関節液を意味する。
- 20

「哺乳類細胞基本培地」とは、細胞が生存するために利用可能な無機塩類と必須アミノ酸またはその誘導体、ビタミン類またはその誘導体を含んだ等張の緩衝液を意味する。「哺乳類細胞基本培地」としては、Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)、RPMI 1640またはAIM-Vなどが例示できる。

- 25      更に本発明は、前述の末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で1～3週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法により得られた破骨

細胞前駆細胞を、支持細胞非存在下で培養することを特徴とする破骨細胞に分化させる方法に関する。具体的には、I L - 3、I L - 7、G M - C S F、Eotaxin、Eotaxin-2、Eotaxin-3又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地で、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる方法に関する。I L - 3、I L - 7、G M - C S F、Eotaxin、Eotaxin-2またはEotaxin-3は、天然型あるいは組換え型のいずれであってもよい。I L - 3、I L - 7、G M - C S F、Eotaxin、Eotaxin-2、Eotaxin-3又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物の含有する培地として、末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清を含有する培地を用いてもよい。末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清として、ヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清を用いる場合もある。

別の態様として、本発明は、本発明の破骨細胞前駆細胞または破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法及び該スクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤に関するものである。

「骨代謝疾患」としては、骨粗鬆症、慢性関節リウマチ、糖尿病にともなう骨量の減少、骨軟化症、大理石骨病などが例示される。

「骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法」としては、例えば、(1)破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化阻害活性を測定する方法、(2)破骨細胞の骨吸収阻害活性を測定する方法などが例示される。治療剤候補化合物が本発明の破骨細胞前駆細胞に対して分化阻害活性を示した場合には、該化合物は抗リウマチ剤として有望である。また、治療剤候補化合物が本発明の破骨細胞に対して骨吸収阻害活性を示した場合には、該化合物は過剰な骨吸収により生じる骨粗鬆症、糖尿病にともなう骨量の減少、骨軟化症などの治療に有用な化合物であることが示唆される。このように、本発明の破骨細胞前駆細胞または破骨細胞を用いることで、in vitroで容易に骨代謝疾患治療剤として有望な化合物のスクリーニングを行なうことができる。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、May-Giemsa 染色後の破骨細胞前駆細胞および破骨細胞を示す顕微鏡写真である。

図 2 は、破骨細胞前駆細胞内および破骨細胞内の TRAP が染色されたことを示す顕微鏡写真である。

図 3 は、象牙スライスを用いた破骨細胞前駆細胞および破骨細胞のリン酸カルシウム吸収能を示す顕微鏡写真である。

図 4 は、破骨細胞が象牙スライスのリン酸カルシウムを吸収することで、形成された吸収窩を示す顕微鏡写真である。

図 5 は、リン酸カルシウム焼結石英ディスクを用いた破骨細胞前駆細胞および破骨細胞のリン酸カルシウム吸収能を示す顕微鏡写真である。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明ので目的とするヒト破骨細胞は以下に示す方法によって得ることが出来る。

#### 破骨細胞前駆細胞の単離

破骨細胞前駆細胞の単離は、(1) 細胞画分の分離工程および(2) 破骨細胞前駆細胞の単離工程からなる。

##### (1) 細胞画分の分離

破骨細胞前駆細胞は、健常人の末梢血または慢性関節リウマチ患者の関節液より得ることができる。該細胞を単離に必要な体液は、健常人の末梢血であれば 50ml~200ml、慢性関節リウマチ患者の関節液であれば 1ml~数十ml である。健常人の末梢血を用いた場合には、該血液をヘパリンあるいはそれに代わる抗凝固剤の存在下で採取する。該血液より細胞画分を分離するため、比重遠心法や塩化アンモニウム等による赤血球の除去により末梢血単核球画分(peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を得る。

一方、慢性関節リウマチ患者の関節液を用いた場合には、該関節液に RPMI1640 などの哺乳類細胞基本培地を添加し、あるいはそのまま遠心分離することで、細胞画分を得ることができる。

#### (2) 破骨細胞前駆細胞の単離

- 5      得られた細胞画分を、DMEMなどの哺乳類細胞基本培地にて、35～37℃、好ましくは37℃、5～7%CO<sub>2</sub>下で数週間、好ましくは1～3週間培養しする。これにより破骨細胞前駆細胞を除く細胞は死滅し、破骨細胞前駆細胞を単離することができる。

#### 破骨細胞の単離

- 10    破骨細胞の単離は、(1) 培養培地の調製工程および(2) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導工程からなる。

#### (1) 培養培地の調製

- AIM-Vなどの哺乳類細胞基本培地に分化誘導のためのサイトカインを添加し、培地を調製する。好ましくは、細菌の繁殖を防止するため、更に抗生物質を添加  
15    する。本発明によれば、破骨細胞前駆細胞を分化誘導するサイトカインとしては、IL-3、IL-7、GM-CSF、Eotaxin、Eotaxin-2、Eotaxin-3が挙げられる。従って、該培地には、これらサイトカインを単独または混合物として添加し、調製する。

#### (2) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導

- 20    得られた破骨細胞前駆細胞を、前述の培養培地で、35～37℃、48～96時間培養する。破骨細胞前駆細胞は、前述のサイトカインの刺激により、破骨細胞に分化する。これにより、破骨細胞のみを単離することができる。

#### 骨代謝疾患治療剤のスクリーニング

- 骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法としては、(1) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化阻害活性を測定する方法、(2) 破骨細胞の骨吸収阻害活性  
25    を測定する方法などが例示される。

### (1) 分化阻害活性の測定方法

本発明により得られた破骨細胞前駆細胞を、例えば、 $1 \times 10^6$ 個/wellとなるように調製して、48 穴プレートなどで培養する。培養に際しては、IL-3、IL-7、GM-CSF、Eotaxin、Eotaxin-2、Eotaxin-3 または末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清を含む哺乳類細胞基本培地を用いる。各 well には、各濃度の治療剤候補化合物を添加する。このように調製したプレートを、37℃、48～96時間培養する。培養後、プレートに付着した細胞を固定し、破骨細胞マーカー酵素である酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)の活性染色を行い、各 well あたりの多核( $N > 3$ )で TRAP 陽性の細胞を破骨細胞としてカウントする。その結果を

5 IC<sub>50</sub>値で示すことにより、候補化合物の破骨細胞前駆細胞に対する分化阻害活性を評価することかできる。

10

### (2) 骨吸収阻害活性の測定方法

本発明により得られた破骨細胞を、例えば、 $1 \times 10^6$ 個/wellとなるように調製して、象牙スライスを敷いた 48 well plate など培養する。培養に際しては、哺乳類細胞基本培地を用いる。各 well には、各濃度の治療剤候補化合物を添加する。このように調製した象牙スライス上で、37℃、48～96時間培養する。培養後、象牙スライスをヘマトキシリンで染色を行う。破骨細胞は、リン酸カルシウムを吸収する。従って、骨吸収があった場合には、吸収された部分(吸収窩)が染色される。生物顕微鏡または電子顕微鏡により、象牙スライスの吸収窩形成の有無を観察する。または、培養上清中のカルシウム濃度の変化を測定する。その結果を IC<sub>50</sub>値で示すことにより、候補化合物の破骨細胞に対する骨吸収阻害活性を評価することかできる。

15

20

破骨細胞形成阻害作用は、抗リウマチ活性を測る指標として重要となりつつある。従って、破骨細胞前駆細胞に対する分化阻害活性を有する化合物は、抗リウマチ剤として有望である。また、骨粗鬆症は、破骨細胞の過剰な骨吸収により生じる。破骨細胞に対する骨吸収阻害活性を有する化合物は、骨粗鬆症の治療剤と

25

して有望である。

## 実施例

### 実施例 1 慢性関節リウマチ患者の関節液由来のヒト破骨細胞の単離

#### (1) 細胞画分の分離

- 5 慢性関節リウマチ患者の関節より関節液を得た。関節液は、4℃で試験管中に保存した。なお、以下の操作は原則として無菌条件下で行う。1ml～数十ml採取する。この関節液に等量のRPMI 1640培地(GIBCO BRL, #22400又はその等価物)を添加した後、1000～2000rpm、4℃、5分間遠心分離し、顆粒球やリンパ球などを含む細胞画分を得た。

#### 10 (2) 破骨細胞前駆細胞の単離

得られた細胞画分を、10% (v/v) ウシ胎仔血清(Fetal Calf Serum:FCS)を添加したDMEM (GIBCO BRL, #12430-21又はその等価物)にて、37℃、5～7%CO<sub>2</sub>下で数週間培養した。これにより破骨細胞前駆細胞を除く細胞は死滅し、破骨細胞前駆細胞(図1、図2)のみが残った。

#### 15 (3) 培地の調製

- 破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる培地を調製した。AIM-V培地(GIBCO BRL, #87-0112)400mlに、RPMI 1640培地(GIBCO BRL, #22400)60ml、ヒトT-STIM40ml(10BRMP/ml; BRMP, Biological Response Modifier Program Jurkat IL-2 reference reagent)、FCS
- 20 10% (V/V) (予め56℃で30分間熱処理し非働化したもの)50mlおよび抗生物質(ペニシリン100U及び100μg/mlストレプトマイシン; GIBCO BRL, #15140-015又はその等価物)を補充して、培地(以下、培地Aと称する)とした。ヒトT-STIMとは、フィトヘマグルチニンで刺激した、ヒト末梢血単核球の培養上清である(Human T-STIM with PHA, Becton Dickinson, #40045)。

#### 25 (4) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導

実施例1(2)で得られた破骨細胞前駆細胞を実施例1(3)に記載の培地A

で刺激すると、37℃・48-96時間で破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が起こり、破骨細胞が得られた(図1、図2)。

(5) 分化誘導能を有するサイトカインの特定

ヒトT-STIMは様々なサイトカインを含有している。このヒトT-STIM  
5 Mに含まれるサイトカインの内、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導能を有するサイトカインを特定するため、実施例1(3)に記載の培地Aの成分を変えて、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞の分化を誘導を試みた。

①培地の調製

培地として、実施例1(3)に記載の培地Aに含まれるヒトT-STIMを以下の  
10 サイトカインまたはサイトカインの混合物に代えて、以下に示す16種類の培地(B~R)を調製した。なお、ヒトT-STIM以外の、AIM-V培地(GIBCO BRL, #87-0112)、RPMI 1640培地(GIBCO BRL, #22400)、FCS 10%(V/V)及び抗生物質(ペニシリン 100U 及び 100 µg/ml ストレプトマイシン; GIBCO BRL, #15140-015 又はその等価物)は培地Aと同一のものを使用した。

15

・培地B: リコンビナントヒトIL-1(R & D Systems, #201-LB あるいは#200-LA またはその等価物) 0.5~5ng/ml+AIM-V培地 400ml+RPMI 1640培地 60ml+ FCS 50ml+抗生物質

20 ・培地C: リコンビナントヒトIL-2(R & D Systems, #202-IL あるいはその等価物) 50~200U/ml+AIM-V培地 400ml+RPMI 1640培地 60ml+FCS 50ml+抗生物質

・培地D: リコンビナントヒトIL-3(R & D Systems, #403-ML-010 あるいはその  
25 の等価物) 2~10ng/ml+AIM-V培地 400ml+RPMI 1640培地 60ml+FCS 50ml +抗生物質



・培地 E：リコンビナントヒト IL-4 (Genzyme, #2181-01 あるいはその等価物)  
50~200U/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS 50ml+ 抗生物  
質

5

・培地 F：リコンビナントヒト IL-6 (R & D Systems, #206-IL あるいはその等価  
物) 10~20ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS 50ml+ 抗  
生物質

10 ・培地 G：リコンビナントヒト IL-6 (R & D Systems, #206-IL あるいはその等価  
物) 10~20ng/ml+ リコンビナントヒト可溶化 IL-6 レセプター (R & D  
Systems, #227-SR あるいはその等価物) 100~300ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+  
RPMI 1640 培地 60ml+ FCS 50ml+ 抗生物質

15 ・培地 H：リコンビナントヒト IL-7 (Genzyme, #1587-00 あるいはその等価物)  
5~20ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS 50ml+ 抗生物質

20 ・培地 I：リコンビナントヒト IL-11 ( R & D Systems, #218-IL あるいはその等  
価物) 1~4ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS 50ml+ 抗生  
物質

培地 J：リコンビナントヒト M-CSF (R & D Systems, #216-MC-010 あるいはそ  
の等価物) 2.5~100ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS  
50ml+ 抗生物質

25

・培地 K：リコンビナントヒト GM-CSF (R & D Systems, #215-GM-010 あるい

はその等価物) 1~5ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS  
50ml+ 抗生物質

・ 培地 L : リコンビナントヒト IL-3 (R & D Systems, #403-ML-010 あるいはそ  
5 の等価物) 2~10ng/ml+ リコンビナントヒト IL-7 (Genzyme, #1587-00 あるいはその等価物) 5~20ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS  
50ml+ 抗生物質

・ 培地 M : リコンビナントヒト IL-7 (Genzyme, #1587-00 あるいはその等価物)  
10 5~20ng/ml+ リコンビナントヒト GM-CSF (R & D Systems, #215-GM-010 あるいはその等価物) 1~5ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS  
50ml+ 抗生物質

・ 培地 N : リコンビナントヒト IL-3 (R & D Systems, #403-ML-010 あるいはその  
15 の等価物) 2~10ng/ml+ リコンビナントヒト IL-7 (Genzyme, #1587-00 あるいはその等価物) 5~20ng/ml+ リコンビナントヒト GM-CSF (R & D Systems, #215-GM-010 あるいはその等価物) 1~5ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS 50ml+ 抗生物質

20 ・ 培地 P : リコンビナントヒト Eotaxin (R & D systems, #320-EO あるいはその等価物) 10~1000 ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS 50ml + 抗生物質

・ 培地 Q : リコンビナントヒト Eotaxin-2 (R & D systems, #343-E2 あるいはその  
25 の等価物) 10~1000 ng/ml+ AIM-V 培地 400ml+ RPMI 1640 培地 60ml+ FCS 50ml+ 抗生物質

・培地 R : リコンビナントヒト Eotaxin-3 10~1000 ng/ml+AIM-V 培地 400ml  
+RPMI 1640 培地 60ml+FCS 50ml+抗生物質 (Eotaxin-3 は、Washington  
University Genome Sequence Center 公開のヒトゲノムシーケンスデータ (H  
5 RG356E01) より CC 型ケモカインと有為の相同性をもつが既知のケモカインと  
は異なるケモカイン蛋白質をコードすると考えられる exon 配列を見出すことに  
より得た。これをもとに配列番号 1 に示す cDNA を単離、該配列を含む組み換え  
バキュロウイルスを作成し、昆虫細胞に感染させ、その培養上清よりリコンビナ  
ント Eotaxin-3 蛋白を回収した。)

10

## ②破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導

実施例 1 (2) で得られた破骨細胞前駆細胞を、前述の培地 B~N を用いて、  
37℃・48~96 時間培養した。このうち、培地 D、H、K、L、M、N、P、  
Q 及び R では破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が確認された。一方、培地  
15 B、C、E、F、G、I 及び J では、破骨細胞前駆細胞の分化が起こらなかった。こ  
の結果、IL-3、IL-7、GM-CSF、Eotaxin、Eotaxin 2、および Eotaxin 3 及びこ  
れらの混合物は、破骨細胞前駆細胞に対する分化誘導能を有することが明らかと  
なった。一方、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-11 及び M-CSF が破骨細胞前駆細胞  
に対する分化誘導能を有しないことも確認された。

20 従来、支持細胞を必要とする破骨細胞前駆細胞の分化においては、IL-1、IL-6、  
IL-11 又は M-CSF はそれぞれ単独で分化を促進するサイトカインであることが  
知られていた。しかし、これらサイトカインが破骨細胞前駆細胞そのものを刺激  
して分化が促進されたものであるか、サイトカインが支持細胞を刺激していた結  
果、破骨細胞前駆細胞の分化が誘導されたのかは明らかではなかった。

25 一方、本発明の支持細胞を必要としない破骨細胞前駆細胞の分化においては、  
IL-3、IL-7、GM-CSF、Eotaxin、Eotaxin 2 および Eotaxin 3 が分化誘導能を有

することが明らかとなった。同時に、破骨細胞前駆細胞そのものの分化に対して、IL-1、IL-6、IL-11 又は M-CSF は少なくとも単独かつ直接には作用しないことが確認された。

## 5 実施例 2 健康人の末梢血液由来のヒト破骨細胞の単離

健康人末梢血由来のヒト破骨細胞の単離

### (1) 細胞画分の分離

健康人の末梢血 50ml~200ml をヘパリンあるいはそれに代わる抗凝固剤の存在下で採取した。Ficoll-paque (Pharmacia Biotech) 比重遠心法により末梢血単核球画分 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を得た。PBMC は FCS 10% (V/V) 含有 RPMI 1640 培地に  $10^7$  個/ml で浮遊後、60mm culture dish に 1~1.5ml/dish、37℃、5-7% CO<sub>2</sub> 下で 1-2 時間培養した。培養後、37℃の FCS 10% (V/V) 含有 RPMI 1640 培地で dish をリンスし、浮遊系細胞を取り除く。dish に付着した細胞は 4℃の血清不含 RPMI 1640 培地で強く洗い流し、末梢血単核球画分 (全 PBMC の約 3-8%) として回収した。

### (2) 破骨細胞前駆細胞の単離

得られた単核球画分 ( $0.5-1 \times 10^6$ /ml) を、実施例 1 (2) と同様に、FCS 10% (v/v) を添加した DMEM (GIBCO BRL; #12430-21 又はその等価物) にて、37℃、5~7% CO<sub>2</sub> 下で数週間培養した。これにより破骨細胞前駆細胞を除く細胞は死滅し、破骨細胞前駆細胞のみが残った。さらに、該単核球画分を PBMC からの単離直後に RA 患者滑膜ナース細胞と共培養することにより、破骨細胞前駆細胞の増殖効率を上昇させることができる。その際、培地は実施例 1 (2) と同じものを用いる。

### (3) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導

この破骨細胞前駆細胞を実施例 1 (3) に記載の培地 A で刺激すると、37℃・48-96 時間で破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が起こり、破骨細胞が

得られた。これにより、慢性関節リウマチ患者関節液からだけでなく、健康人末梢血からも、破骨細胞が単離されることが確認された。

実施例 1 (4) 及び実施例 2 (3) で得られた細胞が、破骨細胞であることの確認は以下の試験例 (1) から (3) に従い行った。

5

### 試験例

#### (1) 形態学的観察

May-Giemsa 染色 (MERCK) により細胞を染色し、顕微鏡を用いて観察した。染色後の破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の顕微鏡写真に代わる図面を図 1 に示す。この結果、分化前の破骨細胞前駆細胞は単球様の形態を有するのに対して、得られた破骨細胞は全て多核 (3 ~ 100 以上) の巨細胞であることが認められた。

#### (2) TRAP 染色

分化前の破骨細胞前駆細胞および分化後の破骨細胞を、酒石酸耐性酸フォスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 染色キット (SIGMA Co.) により染色し、顕微鏡を用いて観察した。染色後の分化前の細胞 (破骨細胞前駆細胞) および分化後細胞 (破骨細胞) の顕微鏡写真に代わる図面を図 2 に示す。この結果、分化前の細胞 (破骨細胞前駆細胞) でも TRAP 陽性であるが、分化後の細胞 (破骨細胞) は核周囲に殊に強い TRAP 陽性像があることが認められた。

#### (3) 骨吸収能

象牙スライスに分化前の破骨細胞前駆細胞を分化のおこる条件 (実施例 1 (4)) で培養後、ヘマトキシリン (SIGMA Co.) で象牙スライスを染色し位相差顕微鏡を用いて観察した。それぞれの表面の顕微鏡写真に代わる図面を図 3 に示す。分化前の破骨細胞前駆細胞は象牙スライスに変化を及ぼさないものの、分化後の破骨細胞はリン酸カルシウムを吸収し、吸収された部分の象牙スライス濃

く染色された。また、分化後の破骨細胞により吸収された象牙スライスを走査電子顕微鏡を用いて観察した。走査電子顕微鏡写真に代わる図面を図4に示す。中央部に吸収窩の形成が認められる。これは象牙質中のリン酸カルシウムが吸収されたことにより、コラーゲン繊維が露出したことにより形成されたものである。

- 5      さらに、リン酸カルシウム焼結石英ディスク（Osteologic™、住商ファーマ）の上で、破骨細胞前駆細胞を実施例1（4）にしたがって分化させ、リン酸カルシウム焼結石英ディスクを位相差顕微鏡を用いて観察した。それぞれの表面の顕微鏡写真に代わる図面を図5に示す。分化前の破骨細胞前駆細胞はリン酸カルシウム焼結石英ディスクに変化を及ぼさないものの、分化後の破骨細胞はリン酸カルシウムの吸収（結晶に空隙のできている部分）が認められた。
- 10

以上、試験例に示された結果より、分化前の細胞が破骨細胞前駆細胞であることおよび分化後の細胞が破骨細胞であることが確認された。

#### 産業上の利用可能性

- 15      本発明によれば、同一個体から繰り返し破骨細胞が入手でき、病態生理学的な検討や免疫学的な検討を加えることができる。また、本発明の破骨細胞前駆細胞または破骨細胞を用いることにより、候補化合物が骨代謝疾患の治療に有用であるか否かのスクリーニングを容易に行うことが可能である。例えば、破骨細胞の骨吸収活性を阻害する化合物をスクリーニングより得た場合、この化合物は、過剰な骨吸収により生じる骨粗鬆症、糖尿病にともなう骨量の減少、骨軟化症などの治療に有用である。
- 20

## 請求の範囲

1. 破骨細胞前駆細胞を支持細胞非存在下で培養することを特徴とする当該破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法。
- 5 2. 培養条件として I L - 3、I L - 7、G M - C S F、Eotaxin、Eotaxin-2、Eotaxin-3 又はこれら 2 以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地を使用する請求項 1 に記載の方法。
3. 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清を含む培地を使用する請求項 1 又は 2 に記載の方法。
- 10 4. 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清がヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である請求項 3 記載の方法。
5. 末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で 1 ～ 3 週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法。
6. 末梢血または関節液をサイトカイン非存在の哺乳類細胞基本培地に添加し、
- 15 35 ～ 37℃、5 ～ 7% CO<sub>2</sub> 下で 1 ～ 3 週間培養することにより、破骨細胞前駆細胞を除く細胞を死滅させ、破骨細胞前駆細胞のみを単離する請求項 5 記載の方法。
7. 請求項 5 または 6 のいずれかに記載の方法により単離されることを特徴とする破骨細胞前駆細胞。
- 20 8. 破骨細胞前駆細胞を支持細胞非存在下で培養することを特徴とする、請求項 5 または 6 のいずれかに記載の方法により得られた当該破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法。
9. 培養条件として I L - 3、I L - 7、G M - C S F、Eotaxin、Eotaxin-2、Eotaxin-3 又はこれら 2 以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地を使用
- 25 する請求項 8 に記載の方法。
10. 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清を含有する培地を使用する請求項

8 又は 9 に記載の方法。

1 1. 末梢血単核球マイトジェン刺激培養上清がヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である請求項 1 0 記載の方法。

5 1 2. 請求項 1 ～ 4、8 ～ 1 1 のいずれかに記載の方法により得られたことを特徴とする破骨細胞。

1 3. 請求項 5 または 6 に記載の方法により単離された破骨細胞前駆細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法。

1 4. 請求項 7 に記載の破骨細胞前駆細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法。

10 1 5. 請求項 1 ～ 4、8 ～ 1 1 のいずれかに記載の方法により分化された破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法。

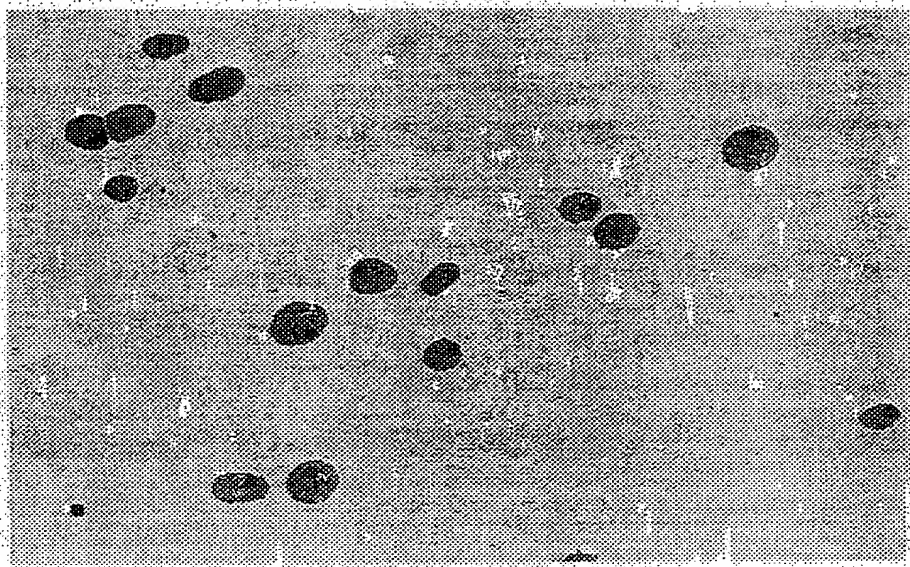
1 6. 請求項 1 2 に記載の破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法。

15 1 7. 請求項 1 3 ～ 1 6 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤。

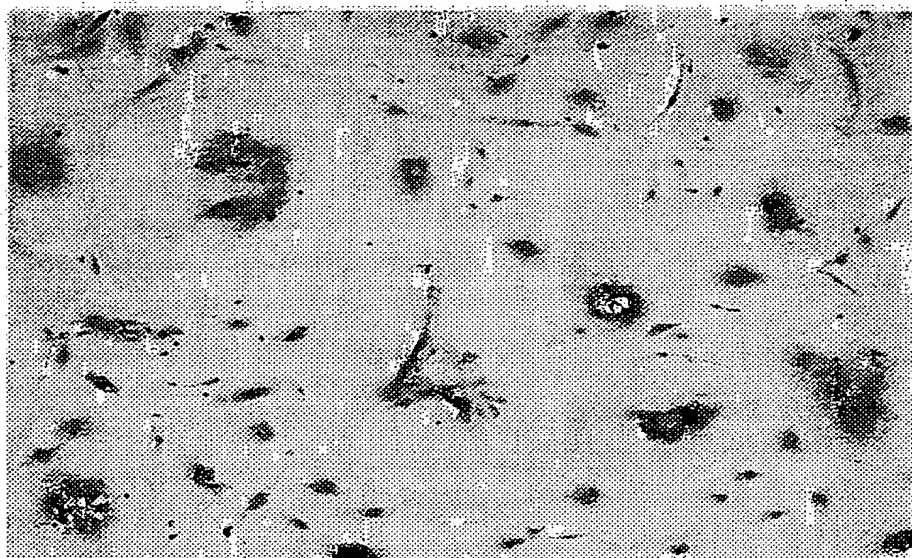


図 1

May-Giemsa 染色

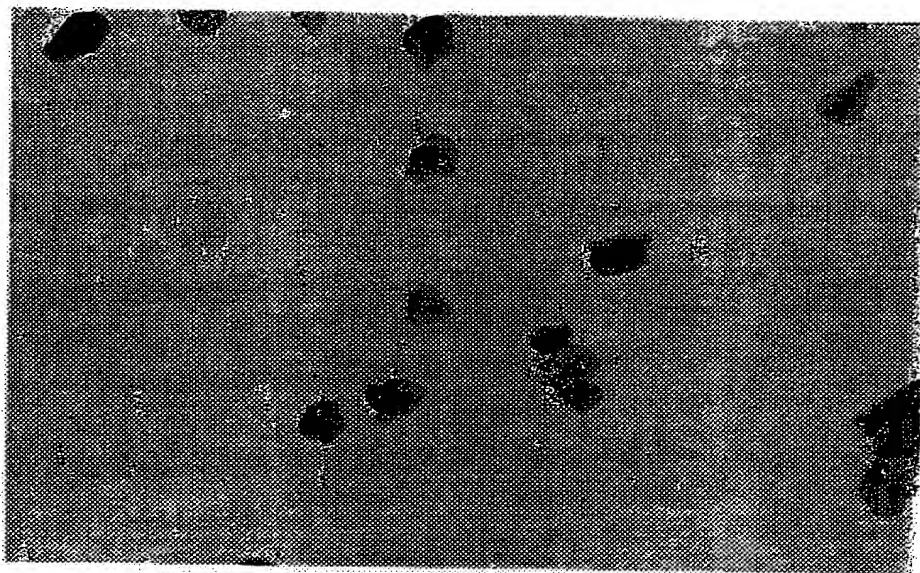


破骨細胞前駆細胞 (×40)

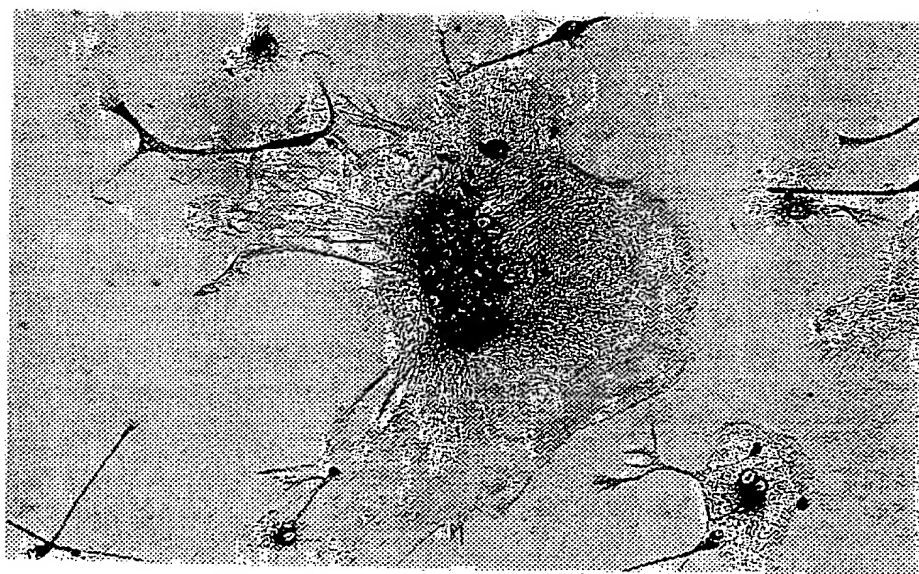


破骨細胞 (×20)

図 2

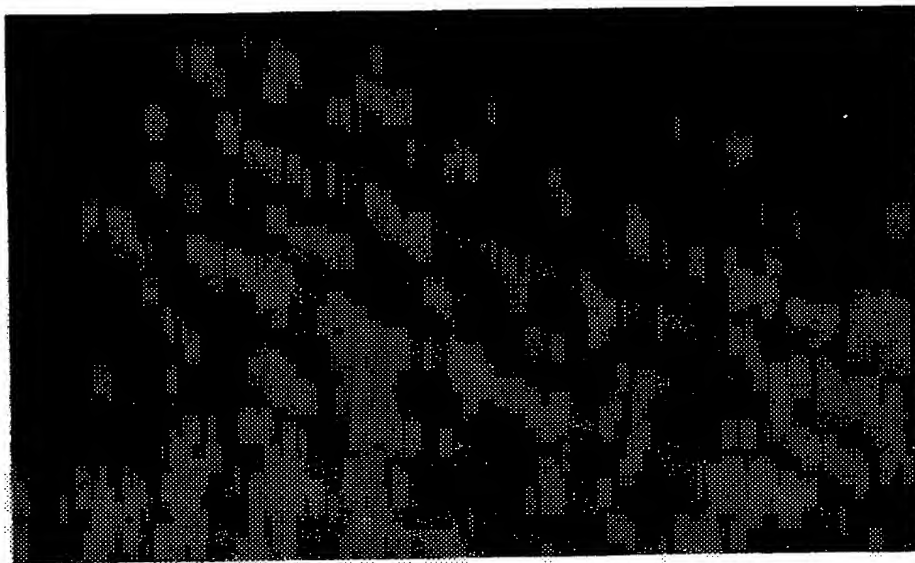


破骨細胞前駆細胞

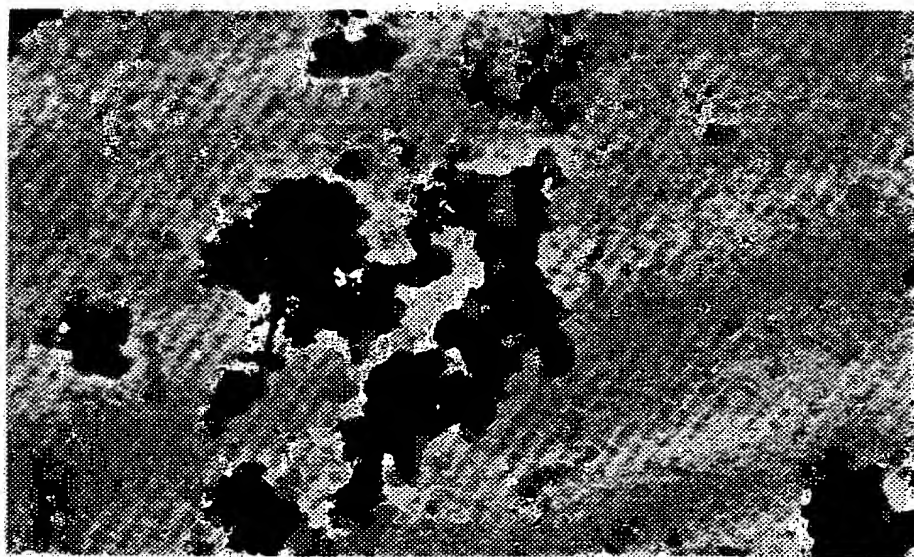


破骨細胞

図3



破骨細胞前駆細胞



破骨細胞

図 4

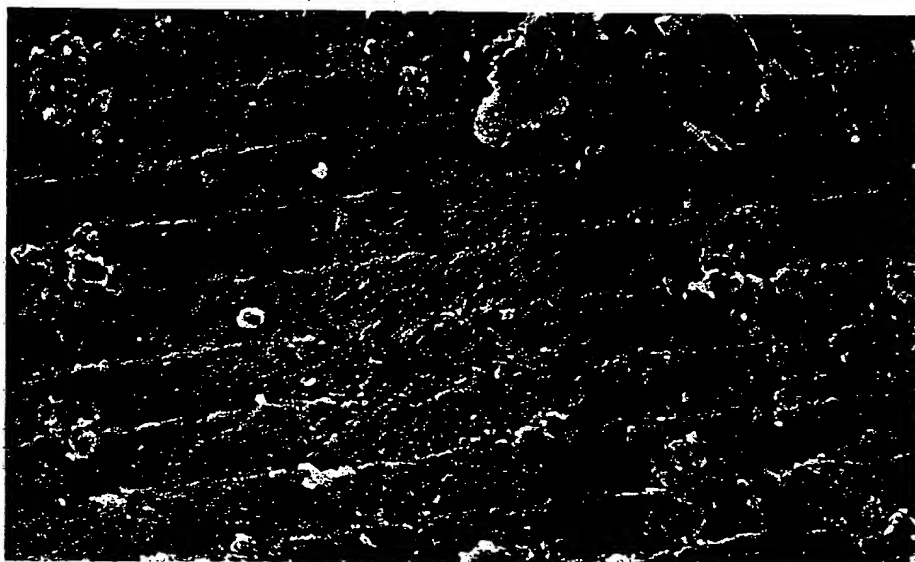
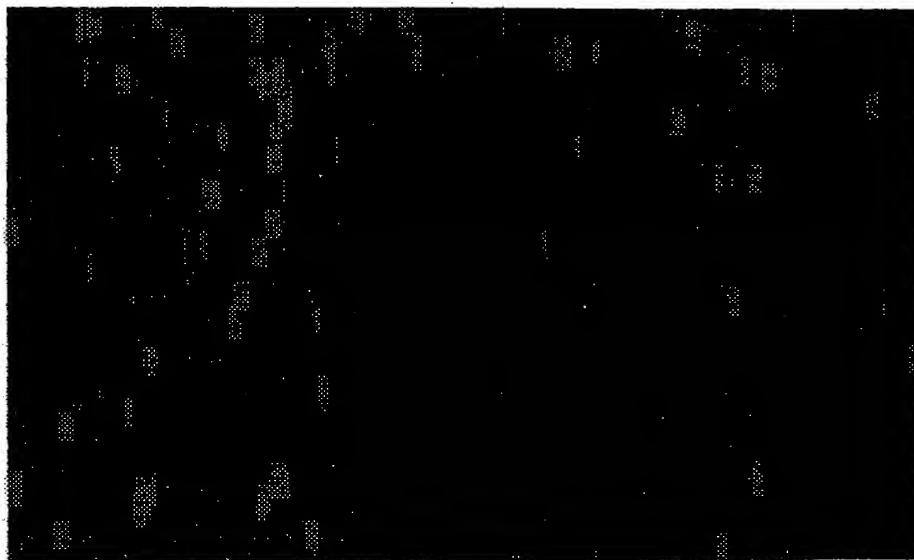
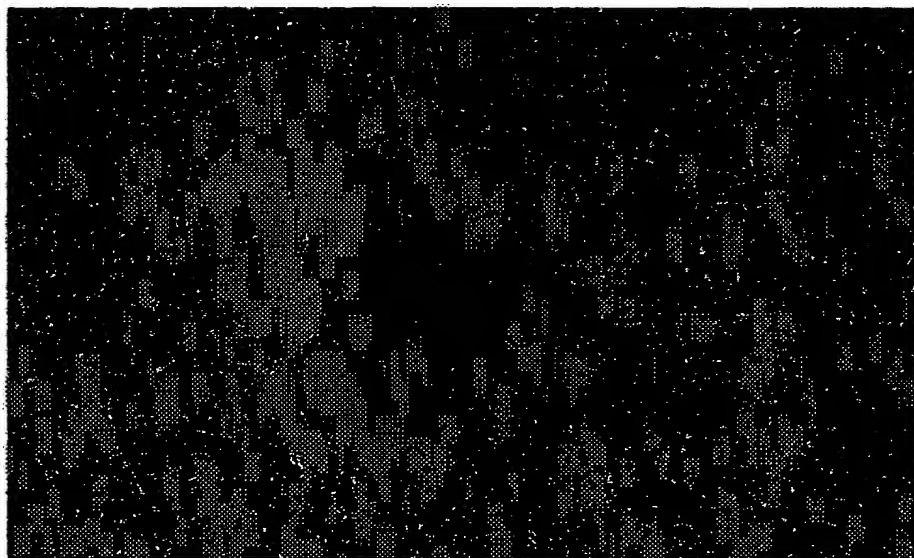


図 5



破骨細胞前駆細胞



破骨細胞

## SEQUENCE LISTING

1 / 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01803

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>Int.C1 <sup>6</sup> C12N5/00, A61K45/00   |   |   |
|---|---|---|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>Int.C1 <sup>6</sup> C12N5/00, A61K45/00   |   |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |   |   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  |   |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |   |   |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |
| X<br>Y  | WO, 96/7733, A1 (ZYMOGENETICS INC.),<br>14 March, 1996 (14. 03. 96),<br>Refer to Claims ; Example 1<br>& US, 5648219, A & EP, 804554, A1<br>& JP, 10-505498, A  | 5-7<br>1-4, 8-17  |
| Y<br>A  | JP, 7-503127, A (Cellpro Inc.),<br>6 April, 1995 (06. 04. 95),<br>Refer to Claims ; Examples<br>& WO, 93/8268, A1 & EP, 614485, A1  | 1-4, 8-17<br>5-7  |
| Y<br>A  | JP, 6-508987, A (Indiana University Foundation),<br>13 October, 1994 (13. 10. 94),<br>Refer to Claims ; Examples<br>& WO, 92/18615, A1 & EP, 584184, A1   | 1-4, 8-17<br>5-7  |
| A   | TATSUYA, TAMURA et al., "Soluble interleukin-6<br>receptor triggers osteoclast formation by<br>interleukin 6", Proc. Natl. Acad. Sci. USA,<br>Vol. 90(24)(1993), p.11924-11928, Refer to ABSTRACT,<br>RESULTS, DISCUSSION | 1-4, 8-12   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.   |   |   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |   |   |
| Date of the actual completion of the international search<br>28 June, 1999 (28. 06. 99)   |   | Date of mailing of the international search report<br>6 July, 1999 (06. 07. 99) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office  |   | Authorized officer  |
| Facsimile No.   |   | Telephone No.   |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N5/00, A61K45/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N5/00, A61K45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X<br>Y          | WO, 96/7733, A1 (ZYMOGENETICS INC.), 14. 3月. 1996 (14. 03. 96),<br>特許請求の範囲及び実施例 1 参照,<br>& US, 5648219, A & EP, 804554, A1 & JP, 10-505498, A | 5-7<br>1-4, 8-17 |
| Y<br>A          | JP, 7-503127, A (セルプロ・インコーポレーテッド), 6. 4月. 1995 (06. 04. 95),<br>特許請求の範囲及び実施例参照,<br>& WO, 93/8268, A1 & EP, 614485, A1                         | 1-4, 8-17<br>5-7 |
| Y<br>A          | JP, 6-508987, A (インディアナ・ユニバーシティ・フアンデーション), 13. 10月. 1994 (13. 10. 94),<br>特許請求の範囲及び実施例参照,<br>& WO, 92/18615, A1 & EP, 584184, A1              | 1-4, 8-17<br>5-7 |

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 06. 99

国際調査報告の発送日

06.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子 印

4 H

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | TATSUYA, TAMURA et al., "Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90 (24) (1993), p. 11924-11928,<br>ABSTRACT, RESULTS及びDISCUSSION参照 | 1-4, 8-12        |



# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

|           |         |
|-----------|---------|
| Req. No.  |         |
| Case. No. | 46720WO |
| Name      | 佐久間     |
| Response  |         |

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:  
YAMAUCHI, Hideaki  
Shionogi & Co., Ltd.  
Patent Dept.  
12-4, Sagisu 5-chome  
Fukushima-ku, Osaka-shi  
Osaka 553-0002  
JAPON

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)



|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
| Date of mailing (day/month/year)<br>21 October 1999 (21.10.99) |  | <b>IMPORTANT NOTICE</b>                                    |  |
| Applicant's or agent's file reference<br>A005990               |  |  |  |
| International application No.<br>PCT/JP99/01803                | International filing date (day/month/year)<br>06 April 1999 (06.04.99) | Priority date (day/month/year)<br>08 April 1998 (08.04.98) |  |
| Applicant<br>SHIONOGI & CO., LTD. et al                        |  |  |  |

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,CN,EP,IL,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 21 October 1999 (21.10.99) under No. WO 99/53023

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

|  |   |
|--|---|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br>Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Authorized officer<br>J. Zahra<br>Telephone No. (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

13 T  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|   |   |  |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference<br>A005990  | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |  |
| International application No.<br>PCT/JP99/01803   | International filing date (day/month/year)<br>06 April 1999 (06.04.1999)  | Priority date (day/month/year)<br>08 April 1998 (08.04.1998) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>C12N 5/00, A61K 45/00 |   |  |
| Applicant<br>SHIONOGI & CO., LTD.   |   |  |

|   |  |
|---|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>   |  |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> |  |

|   |  |
|---|--|
| Date of submission of the demand<br>16 July 1999 (16.07.1999)   | Date of completion of this report<br>28 December 1999 (28.12.1999) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP<br>Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome<br>Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan<br>Facsimile No. | Authorized officer<br><br>Telephone No. (81-3) 3581 1101           |

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01803

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01803

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

|                               |        |      |     |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-17 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-17 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-17 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |

### 2. Citations and explanations

The inventions described in claims 1 through 17 are not described in the documents cited in the ISR nor in the documents considered relevant to the inventions. Nor could a party skilled in the art easily achieve those inventions using a combination of these documents.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/JP99/01803

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 Int.Cl<sup>6</sup> C12N5/00, A61K45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 Int.Cl<sup>6</sup> C12N5/00, A61K45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X<br>Y    | WO, 96/7733, A1 (ZYMOGENETICS INC.),<br>14 March, 1996 (14. 03. 96),<br>Refer to Claims ; Example 1<br>& US, 5648219, A & EP, 804554, A1<br>& JP, 10-505498, A  | 5-7<br>1-4, 8-17      |
| Y<br>A    | JP, 7-503127, A (Cellpro Inc.),<br>6 April, 1995 (06. 04. 95),<br>Refer to Claims ; Examples<br>& WO, 93/8268, A1 & EP, 614485, A1  | 1-4, 8-17<br>5-7      |
| Y<br>A    | JP, 6-508987, A (Indiana University Foundation),<br>13 October, 1994 (13. 10. 94),<br>Refer to Claims ; Examples<br>& WO, 92/18615, A1 & EP, 584184, A1   | 1-4, 8-17<br>5-7      |
| A         | TATSUYA, TAMURA et al., "Soluble interleukin-6<br>receptor triggers osteoclast formation by<br>interleukin 6", Proc. Natl. Acad. Sci. USA,<br>Vol. 90(24)(1993), p.11924-11928, Refer to ABSTRACT,<br>RESULTS, DISCUSSION | 1-4, 8-12             |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search  
 28 June, 1999 (28. 06. 99)

 Date of mailing of the international search report  
 6 July, 1999 (06. 07. 99)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

13 T  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|   |   |  |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference<br>A005990  | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |  |
| International application No.<br>PCT/JP99/01803   | International filing date (day/month/year)<br>06 April 1999 (06.04.1999)  | Priority date (day/month/year)<br>08 April 1998 (08.04.1998) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>C12N 5/00, A61K 45/00 |   |  |
| Applicant<br>SHIONOGI & CO., LTD.   |   |  |

|   |
|---|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>   |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> |

|   |  |
|---|--|
| Date of submission of the demand<br>16 July 1999 (16.07.1999)   | Date of completion of this report<br>28 December 1999 (28.12.1999) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP<br>Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome<br>Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan<br>Facsimile No. | Authorized officer<br><br>Telephone No. (81-3) 3581 1101           |

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01803

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01803

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

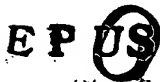
### 1. Statement

|                               |        |      |     |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-17 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-17 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-17 | YES |
|                               | Claims |      | NO  |

### 2. Citations and explanations

The inventions described in claims 1 through 17 are not described in the documents cited in the ISR nor in the documents considered relevant to the inventions. Nor could a party skilled in the art easily achieve those inventions using a combination of these documents.

P C T



国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
[ P C T 1 8 条、P C T 規則43、44 ]

|                                       |  |                                     |
|---------------------------------------|--|-------------------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号      A 0 0 5 9 9 0  | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0 )<br>及び下記 5 を参照すること。 |                                     |
| 国際出願番号<br>P C T / J P 9 9 / 0 1 8 0 3 | 国際出願日<br>(日.月.年)      0 6 . 0 4 . 9 9                                | 優先日<br>(日.月.年)      0 8 . 0 4 . 9 8 |
| 出願人 (氏名又は名称)<br><br>塩 野 義 製 薬 株 式 会 社 |  |                                     |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 ( P C T 1 8 条 ) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で      3      ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2.    ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照) 。

3.    ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照) 。

4. 発明の名称は      ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は      ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 ( P C T 規則38.2(b) ) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
 第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。      ☒ なし  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N5/00, A61K45/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N5/00, A61K45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X<br>Y          | WO, 96/7733, A1 (ZYMOGENETICS INC.), 14. 3月. 1996 (14. 03. 96),<br>特許請求の範囲及び実施例 1 参照,<br>& US, 5648219, A & EP, 804554, A1 & JP, 10-505498, A | 5-7<br>1-4, 8-17 |
| Y<br>A          | JP, 7-503127, A (セルフ・ロ・インコーポレーテッド), 6. 4月. 1995 (06. 04. 95),<br>特許請求の範囲及び実施例参照,<br>& WO, 93/8268, A1 & EP, 614485, A1                        | 1-4, 8-17<br>5-7 |
| Y<br>A          | JP, 6-508987, A (インテリナ・ユニバーシティ・ファンデーション), 13. 10月. 1994 (13. 10. 94),<br>特許請求の範囲及び実施例参照,<br>& WO, 92/18615, A1 & EP, 584184, A1               | 1-4, 8-17<br>5-7 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 06. 99

国際調査報告の発送日

06.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

印

4 H

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | TATSUYA, TAMURA et al., "Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90 (24) (1993), p. 11924-11928,<br>ABSTRACT, RESULTS及びDISCUSSION参照 | 1-4, 8-12        |

P C T

国際予備審査報告

REC'D 14 JAN 2000

WIPO PCT

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

|   |   |                                |
|---|---|--------------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 A 0 0 5 9 9 0   | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/<br>IPEA/416)を参照すること。 |                                |
| 国際出願番号<br>PCT/J P 9 9 / 0 1 8 0 3                                       | 国際出願日<br>(日.月.年) 0 6 . 0 4 . 9 9                      | 優先日<br>(日.月.年) 0 8 . 0 4 . 9 8 |
| 国際特許分類 (IPC)<br>Int.Cl <sup>7</sup> C 1 2 N 5 / 0 0 , A 6 1 K 4 5 / 0 0 |   |                                |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>塩 野 義 製 菓 株 式 会 社                                       |   |                                |

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

|   |                                   |             |
|---|-----------------------------------|-------------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>1 6 . 0 7 . 9 9                               | 国際予備審査報告を作成した日<br>2 8 . 1 2 . 9 9 |             |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁 (IPEA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員)<br>坂 崎 恵 美 子      | 4 N 9 4 5 1 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3488   |                                   |             |

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲

1-17

有

請求の範囲

無

進歩性 (IS)

請求の範囲

1-17

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲

1-17

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1-17に記載された発明は、国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせることにより当業者にとって容易に発明できたものでもない。

5000  
09646899  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|   |   |  |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>D1 PAT 478 WO</b>   | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |  |
| International application No.<br><b>PCT/IB99/00941</b>  | International filing date ( <i>day/month/year</i> )<br><b>06 April 1999 (06.04.99)</b>  | Priority date ( <i>day/month/year</i> )<br><b>09 April 1998 (09.04.98)</b> |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br><b>C09D 17/00, C09C 1/00, D21H 19/38, 19/58</b> |   |  |
| Applicant<br><b>PLUESS-STAUER AG</b>  |   |  |

|   |
|---|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>   |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> |

|  |   |
|--|---|
| Date of submission of the demand<br><b>04 November 1999 (04.11.99)</b> | Date of completion of this report<br><b>10 July 2000 (10.07.2000)</b> |
| Name and mailing address of the IPEA/EP                                | Authorized officer  |
| Facsimile No.  | Telephone No.   |



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/IB99/00941

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1 - 67, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1 - 37, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/5 - 5/5, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/IB 99/00941

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

|                               |        |   |     |
|-------------------------------|--------|---|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 3, 4, 6, 14, 16, 17, 20, 23-28, 31-37     | YES |
|                               | Claims | 1, 2, 5, 7-13, 15, 18, 19, 21, 22, 29, 30 | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 3, 4, 6, 14, 16, 17, 20, 23-28, 31-37     | YES |
|                               | Claims |   | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-37                                      | YES |
|                               | Claims |   | NO  |

### 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: DE 43 12 463 C (PLUSS STAUFFER AG) 28 July 1994  
(1994/07/28)

D2: EP-A-0 332 102 (PLUSS STAUFFER AG) 13 September  
1989 (1989/09/13)

- Claim 1 refers to a composite composition of fillers or pigments characterized in that the fillers or pigments are "co-structured" or "co-adsorbed", that is to say, the hydrophilic and organophilic particles "have structural cohesion as a result of bonding or adhesion achieved between at least two particles of different surface conditions" (see page 3, lines 23-26).  
This definition is interpreted in the sense that the interaction of a (small) portion of the hydrophilic particles with a (small) portion of the organophilic particles is enough to produce a "co-structured" or "co-adsorbed" state.  
The binder can be selected among acidic or (partially) neutralized acrylic (co)polymers. The claimed composition contains 0.01% to 10% by dry weight of the binder (see claims 7, 8, 12).

D1 describes an (aqueous) composite composition of mineral pigments containing 24-64% by weight of  $\text{CaCO}_3$ ,  
5-40% by weight of talc,  
0.05-1.4% by weight of a grinding agent having an acrylic (co)polymer base (with a specific viscosity, preferably between 0.3 and 0.8), and  
0.05-1.2% by weight of a dispersing agent [acrylic (co)polymer],  
see D1, claims 1 and 13-22; page 4, lines 44-65; example.

The binding agents (b) used for the composite composition suspensions of tests nos. 43-46, which are used as tests nos. 58-61 in example 6, are also acrylic polymers (specific viscosity between 0.95 and 5.00). Nevertheless, tests nos. 58-61 and the prior art test no. 56 (corresponding to test no. 1) show that the suspensions according to the invention have a  $\text{CaCO}_3$  content that is more uniform in a variety of ways than the suspension containing only conventional acrylic dispersing agents. It can therefore be deduced that the structure of the composite compositions according to the invention is different from that of the compositions disclosed in the passages of D1 cited in the international search report.

2. However, D1 (as well as D2) discloses a paper coating slip made of a composite composition as mentioned above and  
5 parts by weight (based on 100 parts by weight of mineral pigments) of an acrylic binder,  
see D1, page 6, example of use.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/IB 99/00941

In said coating slip, at least one (small) portion of the hydrophilic and organophilic pigments of the composite composition are probably in a "co-structured" or "co-adsorbed" state.

Therefore, it is assumed that at least the subject matter of claims 1, 2, 5, 7-13, 15, 18, 19, 21, 22, 29 and 30 is not novel over D1 (or D2) (PCT Article 33(2)).

3. The documents cited in the international search report do not explicitly mention a composite composition of "co-structured" or "co-adsorbed" particles. It follows that in so far as the invention is novel, it appears to patentable.